

B. 研究方法

関東近郊を中心とした 17 施設（東京女子医科大学病院、東京大学医学部附属病院、社会保険中央病院、順天堂大学医学部附属病院、日本大学医学部附属病院、東京慈恵会医科大学附属病院、東海大学医学部附属病院、北里大学医学部附属病院、聖マリアンナ医科大学附属病院、横浜市立大学医学部附属病院、東京厚生年金病院、慶応大学医学部附属病院、NTT 東日本関東病院、千葉大学医学部附属病院、帝京大学医学部附属病院、埼玉医科大学附属病院、国立神戸病院）にて、2000 年 12 月より 1 年間発生した全ての真菌血症つき、血液培養から検出された菌株を全て、分担研究者；菊池の元に収集する。得られた菌株は東京女子医科大学にて再同定を行い、NCCLS による微量液体希釈法にて amphotericin B, 5-fluorocytosine, fluconazole, itraconazole, voriconazole, CS-758, micafungin, aureobasidin A の MIC を測定した。また、臨床例は世界で 1 例しか報告のない *Cryptococcus curvatus* が今回の prospective study では 3 例も検出されたため、東京女子医大病院にて過去 5 年間に経験されたクリプトコッカス症について調査し、*Cryptococcus curvatus* の検出例 8 症例について、その患者背景、臨床像、検出菌の細菌学的検討を行った。

（倫理面への配慮）

調査票には個人情報が含まれるため、その情報は厳密に管理する。特に最近ではコンピューターハッカー被害が相次いでいるため、集計のための入力には外部ネットワーク、インターネットに接続していないコンピューターに限定した。

C. 研究結果

1) 検出真菌の分布

回収された 203 株中、192 株（94.6%）とほと

んどが *Candida* 属であった。*Candida* の菌種では、*C. albicans* が 89 株（43.8%）と最も多かったが、Non-*albicans* 全体が 103 株と、過半数を占めた。Non-*albicans* では *C. parapsilosis* が 55 株と多く、次いで *C. tropicalis* 21 株、*C. glabrata* 21 株で 3 菌種合わせると 97 株と 50.5%に達していた。他の *Candida* sp. は最近耐性菌として注目されている *C. krusei* を含め、数株にとどまっていた。

Candida 以外の稀な真菌ではほとんど臨床報告の見られない *Cryptococcus curvatus* が 2 施設 3 名の患者から 3 株認められた。また、*Rhodotorula* が 2 名の患者から 2 株、糸状菌では *Fusarium solani* が 1 例から 1 株検出されていた。表 1 に結果を示す。

Table 1. 真菌血症由来 203 株の菌種別内訳

	株数	%
<i>Candida</i> , total	192	94.6
<i>C. albicans</i>	89	43.8
<i>C. parapsilosis</i>	55	27.1
<i>C. glabrata</i>	21	10.3
<i>C. tropicalis</i>	21	10.3
<i>C. krusei</i>	2	1.0
<i>C. guilliermondii</i>	2	1.0
<i>C. lusitanae</i>	1	0.5
Unidentified <i>Candida</i> sp.	1	0.5
<i>Trichosporon asahii</i>	2	1.0
<i>Cryptococcus</i> , total	5	2.5
<i>C. curvatus</i>	3	1.5
<i>C. neoformans</i>	2	1.0
<i>Rhodotorula</i> sp.	3	1.5
<i>Fusarium solani</i>	1	0.5
Total	203	100.0

2) 検出真菌の各種抗真菌剤に対する MIC 分布

表 2-5 に測定した 8 種類の抗真菌剤の MIC 分布を MIC range, MIC50, MIC90, 耐性率（耐性基準のあるもの）で示した。

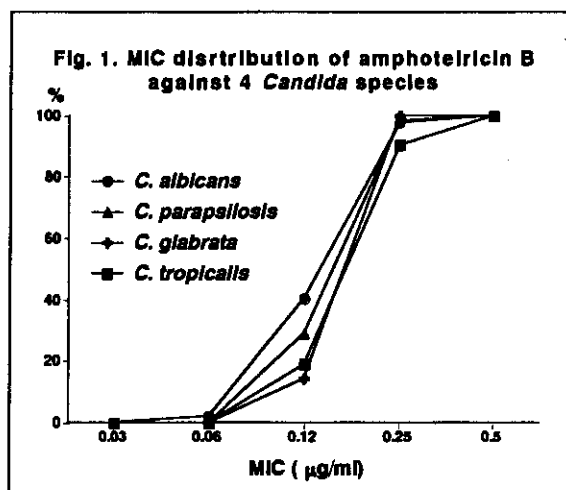
amphotericin B の *Candida* 属に対する抗菌力は良好で *C. krusei* 以外の菌種に対してはすべて 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 以下であった。amphotericin B の他の菌種への MIC は *Trichosporon*, *Fusarium* 以外は 1 $\mu\text{g/ml}$ 以下であった。

Table 2. MICs of amphotericin B and 5-fluorocytosine

Species	MIC (mg/L)						
	Amphotericin B			5-Fluorocytosine			
	Range	MIC50	MIC90	Range	MIC50	MIC90	%R
<i>C. albicans</i> (88)	0.08-0.5	0.25	0.25	<0.02-32	0.25	0.5	1.1
<i>C. parapsilosis</i> (88)	0.12-0.5	0.25	0.25	0.12-32	0.5	2	2.7
<i>C. glabrata</i> (21)	0.12-0.25	0.25	0.25	0.25-32	0.12	0.25	4.8
<i>C. tropicalis</i> (21)	0.12-0.5	0.25	0.25	0.25-4	0.5	2	0
<i>C. guilliermondii</i> (2)	0.12-0.25	0.12	0.25	0.25-0.5	0.25	0.5	0
<i>C. krusei</i> (2)	0.5-1	0.5	1	32	32	32	100
<i>C. lusitanae</i> (1)	0.12			0.08			
<i>Candida</i> sp. (1)	0.12			0.5			
<i>C. neoformans</i> (2)	0.12	0.12	0.12	4-32	4	32	
<i>C. curvulus</i> (2)	0.04-0.25	0.25	0.25	2-32	>32	>32	
<i>Rhodotorula</i> sp. (2)	0.12-0.25	0.12	0.25	0.5-2	0.5	2	
<i>F. solani</i> (2)	2-4	2	4	>32	>32	>32	
<i>Fusarium solani</i> (1)	2			>32			

*%R: %Resistant

図 1 に主要な *Candida* 属 4 種 (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*) に対する amphotericin B の MIC 累積分布を示した。いずれの菌種に対する MIC 分布もほぼ同一であった。



5-fluorocytosine の耐性は *Candida* 属で 6 株 (3.1%) に認められた。*C. ryptococcus*, *Trichosporon*, *Fusarium* に対する MIC はいずれも高い傾向を示した。

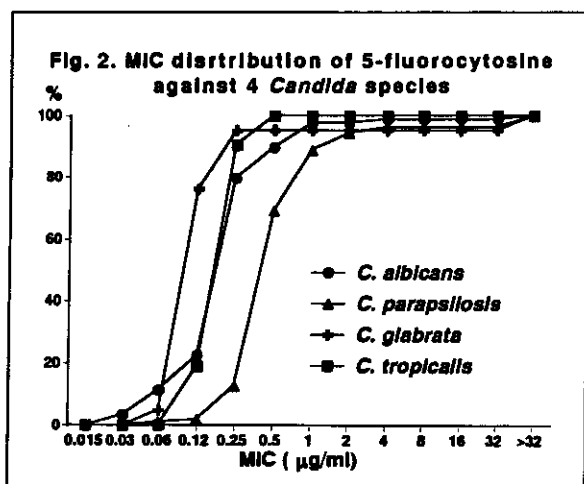


図 2 に fluorocytosine の MIC の累積分布を示した。他の 3 菌種に比べて、*C. parapsilosis* の MIC が耐性側にシフトしていた。

azole 系薬剤では fluconazole 耐性は *C. glabrata* 2 株 (9.5%)、*C. krusei* 2 株 (100%) に、itraconazole 耐性は *C. albicans* 1 株 (1.1%)、*C. glabrata* 3 株 (14.3%) にみられたが、国外の報告に比して、それ程耐性率は高くなかった。*Rhodotorula*, *Fusarium* に対する MIC は両薬剤とも著しく高い値を呈した。

Table 3. MICs of fluconazole and Itraconazole

Species	MIC (µg/ml)						
	Fluconazole				Itraconazole		
	Range	MIC50	MIC90	%R	Range	MIC50	MIC90
<i>C. albicans</i> (88)	<0.02-0	1	2	0	<0.005-1	0.02	0.08
<i>C. parapsilosis</i> (88)	1-8	2	4	0	0.015-0.25	0.02	0.12
<i>C. glabrata</i> (21)	0-64	16	32	9.5	0.12-4	0.25	1
<i>C. tropicalis</i> (21)	1-16	2	8	0	0.015-0.12	0.08	0.12
<i>C. guilliermondii</i> (2)	0-16	0	16	0	0.12	0.12	0.12
<i>C. krusei</i> (2)	>64	>64	>64	100	0.25-0.5	0.25	0.5
<i>C. lusitanae</i> (1)	2				0.12		
<i>Candida</i> sp. (1)	1				0.12		
<i>C. neoformans</i> (2)	0-16	0	16		0.12	0.12	0.12
<i>C. curvulus</i> (2)	0-16	0	16		0.04-0.25	0.08	0.25
<i>Rhodotorula</i> sp. (2)	>64	>64	>64		0.5-4	1	>4
<i>F. solani</i> (2)	16	16	16		0.12-0.25	0.12	0.25
<i>Fusarium solani</i> (1)	>64				>4		

*%R: %Resistant

図 3 に *Candida* 属 4 種に対する fluconazole の MIC 累積分布を示した。*C. parapsilosis*, *C. tropicalis* はほぼ同一の分布を示し、やや *C. albicans* より耐性側にシフトし、*C. glabrata* が更に耐性側に分布していた。

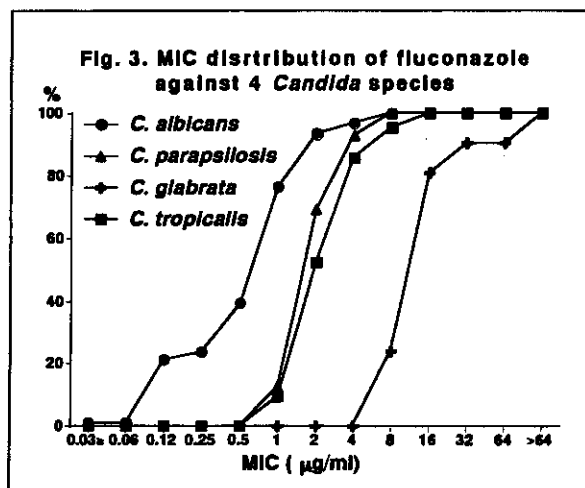
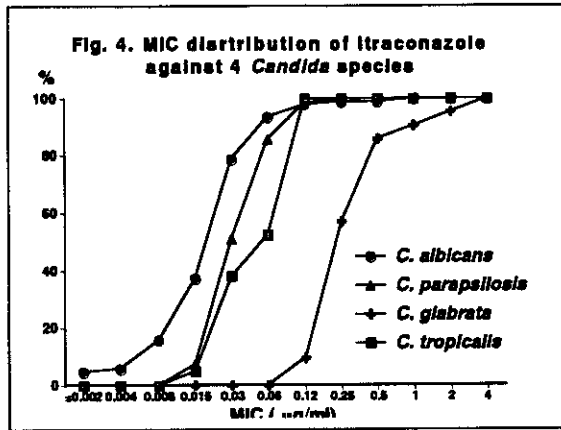


図 4 に *Candida* 属 4 種に対する itraconazole の MIC 累積分布を示した。いずれの菌種に対する MIC 分布は fluconazole とほぼ同一であった。



新しく開発された voriconazole, CS-758 の MIC は *Candida* 属では itraconazole に比しても良好で、CS-758 は *Cryptococcus* にも良好な抗菌力を呈した。いずれの薬剤の MIC 分布も *C. albicans* < *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* < *C. glabrata* の順に耐性側にシフトしていることがわかる。他の 3 菌種に比べて、*C. parapsilosis* の MIC が耐性側にシフトしていた。

Table 4. MICs of voriconazole and CS-758

Species	Voriconazole			CS-758		
	Range	MIC50	MIC90	Range	MIC50	MIC90
<i>C. albicans</i> (88)	≤ 0.008 -0.12	0.016	0.03	≤ 0.004 -0.06	0.008	0.015
<i>C. parapsilosis</i> (68)	≤ 0.008 -0.12	0.03	0.06	≤ 0.008 -0.06	0.015	0.03
<i>C. glabrata</i> (21)	0.03-2	0.12	0.8	0.03-1	0.12	1
<i>C. tropicalis</i> (21)	≤ 0.008 -0.25	0.06	0.25	≤ 0.004 -0.08	0.016	0.03
<i>C. guilliermondii</i> (2)	0.015-0.03	0.015	0.03	0.008-0.03	0.008	0.03
<i>C. krusei</i> (2)	1	1	1	0.5	0.5	0.5
<i>C. lusitanae</i> (1)	≤ 0.008			≤ 0.004		
<i>Candida</i> sp. (1)	0.06			0.008		
<i>C. neoformans</i> (2)	0.03-0.06	0.03	0.06	0.008-0.016	0.008	0.015
<i>C. curvatus</i> (3)	0.06-0.12	0.12	0.12	0.03	0.03	0.03
<i>Rhodotorula</i> sp. (2)	1-8	4	8	0.12-0.5	0.25	0.5
<i>T. asahii</i> (2)	0.06	0.06	0.06	0.03	0.03	0.03
<i>Fusarium solani</i> (1)	1			>8		

図 5 に主要 *Candida* 属 4 種に対する voriconazole の MIC の累積分布を示した。

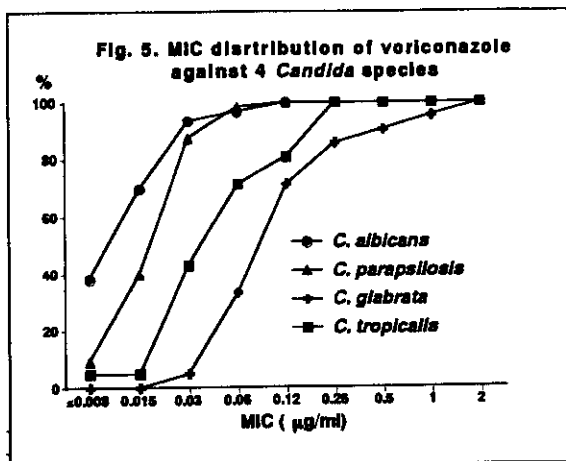
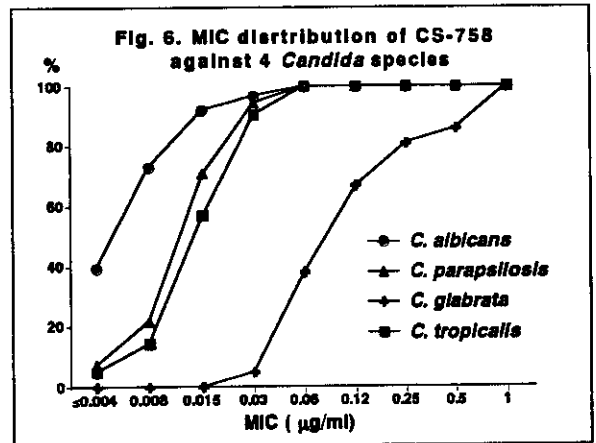


図 6 に主要 *Candida* 属 4 種に対する CS-758 の MIC の累積分布を示した。



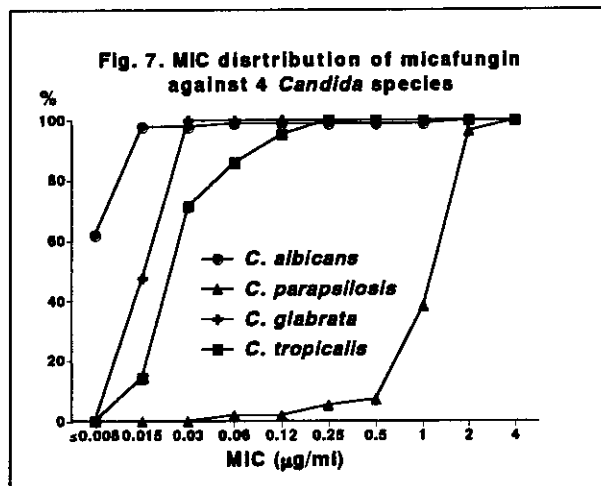
両者はほぼ同じような MIC 分布を示しているが、CS-758 では voriconazole に比べて、*C. tropicalis* に対する抗菌力が優れていた。

新しく上市された micafungin は *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* に対しては MIC90 がそれぞれ、0.015, 0.03, 0.12, 0.12 µg/ml と良好であったが、*C. parapsilosis* では MIC90 が 2 µg/ml とやや高く、*Cryptococcus*, *Trichosporon*, *Fusarium*, *Rhodotorula* に対しては全く抗菌力を示さなかった。

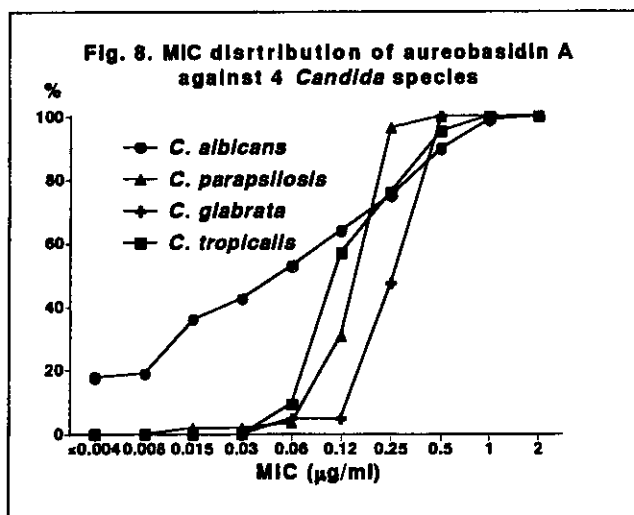
Table 5. MICs of micafungin and aureobasidin A

Species	Micafungin			Aureobasidin A		
	Range	MIC50	MIC90	Range	MIC50	MIC90
<i>C. albicans</i> (88)	≤ 0.008 -2	≤ 0.008	0.015	≤ 0.004 -1	0.06	1
<i>C. parapsilosis</i> (68)	0.05-4	2	2	0.015-0.5	0.25	0.25
<i>C. glabrata</i> (21)	0.015-0.03	0.03	0.03	0.06-0.5	0.5	0.5
<i>C. tropicalis</i> (21)	0.015-0.25	0.03	0.12	0.06-1	0.12	0.5
<i>C. guilliermondii</i> (2)	2	2	2	0.12	0.12	0.12
<i>C. krusei</i> (2)	0.12-0.25	0.12	0.25	0.12	0.12	0.12
<i>C. lusitanae</i> (1)	0.12			0.5		
<i>Candida</i> sp. (1)	0.03			0.06		
<i>C. neoformans</i> (2)	>16	>16	>16	0.5-1	0.5	1
<i>C. curvatus</i> (3)	>16	>16	>16	0-0	0	>8
<i>Rhodotorula</i> sp. (3)	>16	>16	>16	0-0	0	>8
<i>T. asahii</i> (2)	>16	>16	>16	0	0	>8
<i>Fusarium solani</i> (1)	>16			0		

図 7 に主要 *Candida* 属 4 種に対する micafungin の MIC の累積分布を示した。抗菌力は特に *C. albicans* に対して優れており、*C. glabrata*, *C. tropicalis* にも良好な抗菌力を示しているが、*C. parapsilosis* に対する MIC 分布が大きく耐性側にシフトしていることがわかる。



黒色真菌から発見された新しい抗真菌剤、aureobasidin Aの抗菌力は *Candida* 属、*Cryptococcus neoformans* では良好であったが、*C. curvatus*, *Rhodotorula*, *Trichosporon*, *Fusarium* には及ばなかった。図 8 に主要 *Candida* 属 4 種に対する aureobasidin A の MIC の累積分布を示した。*C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* はほぼ同等の MIC 分布を示すが、*C. albicans* に対しては幅広い MIC 分布を呈していた。



3) 新興真菌感染症「*Cryptococcus curvatus* 感染症」

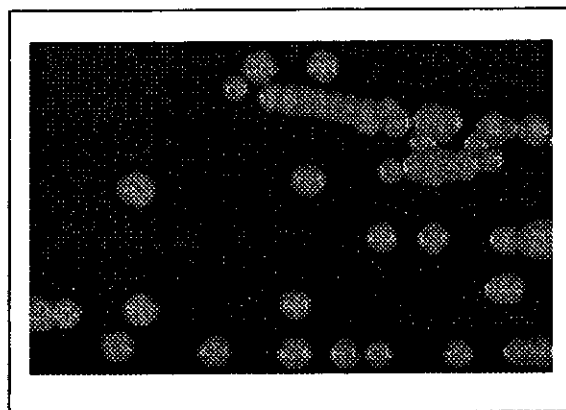
C. curvatus は saprophytic *Cryptococcus* の 1 菌種であり、環境中より検出され、病原性はほとんどないものと考えられていた。薄い荚膜を作るものの、形態的には紡錘型を呈し、生化学的性

状も *C. neoformans* とは異なる。現在までにヒト感染症から分離された *C. curvatus* は AIDS 患者の脊髄根神経炎由来のわずかに 1 株のみであり、無論、本邦からの報告は皆無であった。

今回の prospective study で血液培養由来の 3 株が *C. curvatus* と同定されたので、東京女子医大病院で過去 5 年間に *Cryptococcus* の分離された 20 症例につき、*C. curvatus* 感染症の有無を調査した。

図 9 にサブローブドウ糖寒天培地上の *C. curvatus* のコロニーを示す。*C. neoformans* にも似たムコイド型コロニーを呈する。

Fig. 9. Colonies of *Cryptococcus curvatus* on Sbouraud-dextrpse agar (25C, 72 h)



C. curvatus は 8 例から分離されており、いずれも有意の起因菌と考えられた。患者背景を表 6 に示す。

Table 6. Patient background of *C. curvatus* infections

Patient background	Data
Male:Female	4:4
Age, range	2-82
Age, median	52.6
Age over 60 (%)	5/8 (62.5)
Clinic	
Surgery related (%)	3 (37.5)
Medicine related (%)	5 (62.5)

男女比は 1:1、比較的高齢者に多いものの、2 歳の症例もあり、全て入院患者であった。診療科では内科系が多かった。

表 7 に 8 症例の臨床特徴を示す。

Table 7. Clinical characteristics of *C. curvatus* infection cases

Case	Age	Sex	Diagnosis of infectious disease	Underlying diseases or conditions	CVC catheter	Antifungal chemotherapy	Outcome
Case 1	74	M	Catheter-related sepsis	Emphysema, Atrial fibrillation	+	Fluconazole	Alive
Case 2	77	M	Sepsis with pneumonia	Fungal	+	Fluconazole → amphotericin B	Dead
Case 3	47	F	Surgical site infection	Alimentary carcinoma	-	-	Alive
Case 4	67	M	Peritonitis	Colon carcinoma	-	-	Alive
Case 5	6	F	Catheter-related sepsis	DM, Asplenia	+	-	Alive
Case 6	62	F	Catheter-related sepsis	Acute promyeloid leukemia	+	-	Alive
Case 7	67	F	Catheter-related sepsis	Pancreatic carcinoma	+	-	Alive
Case 8	2	M	Septicemia	TGA	+	Fluconazole	Dead

8 症例中 7 例で中心静脈 (CVC) カテーテルを使用しており、4 例はカテーテル感染と考えられた。これら 4 例及び手術後感染の 2 例はカテーテル抜かないし創部の洗浄、debridement により軽快した。しかし、2 例は抗真菌薬の投与などを行ったにもかかわらず、死亡した。

表 8 に *C. curvatus* 8 株に対する各種抗真菌薬の MIC を示した。5-fluorocytosine, fluconazole, micafungin, aureobacidin A の MIC は高く、azole 系の CS-758 が最も良好な値を呈していた。

Table 8. MICs of antifungal agents against 8 strains of *C. curvatus*

Antifungal agent	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
	Range	MIC ₅₀	MIC ₉₀
Amphotericin B	0.06-0.5	0.12	0.5
Fluorocytosine	8->32	>32	>32
Fluconazole	16-64	32	64
Itraconazole	0.12-1	0.5	1
Voriconazole	0.12-1	0.25	1
CS-758	0.015-0.12	0.03	0.12
Micafungin	>16	>16	>16
Aureobacidin A	>8	>8	>8

D. 考案

血液培養から検出される *Candida* 属のうち、近年 azole 系抗真菌薬の普及に伴い、*C. albicans* 以外の *Candida* の比率が高まるとする報告がみられている。今回の我々の成績もこれを裏付ける結果であった。しかし、fluconazole 耐性は *C. glabrata* 2 株 (9.5%)、*C. krusei* 2 株 (100%) に、itraconazole 耐性は *C. albicans* 1 株 (1.1%)、*C. glabrata* 3 株 (14.3%) にみられたのみで、国外の報告に比して、それ程高くなかった。この理

由は不明であるが、*C. albicans* に比較すると明らかに fluconazole の MIC 分布の高い *C. parapsilosis* の分離頻度が高いことには注意が必要と思われる。NCCLS では amphotericin B への耐性の breakpoint を設定していないが、少なくとも MIC 2 $\mu\text{g/ml}$ 以上の菌は yeast では認められず、臨床で依然、有用な抗真菌薬と考えられた。

新しい azole 系抗真菌薬では voriconazole, CS-758 共に、*C. glabrata*, *C. krusei* 以外の *Candida*, *Cryptococcus* に対する抗菌力に優れ、今後の臨床への適用が期待される。

β -glucan 阻害剤である新しい candin 系抗真菌薬、micafungin は *C. albicans* に対して極めて優れた抗菌活性を示し、fluconazole の MIC の比較的高い *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis* にも良好な抗菌力を呈した。fluconazole, itraconazole との交叉耐性がなく、深在性真菌症に対する抗真菌薬の新たな選択肢として期待される。但し、*Cryptococcus*, *Fusarium*, *Rhodotorula* には抗菌力を呈さず、*C. parapsilosis* への抗菌力がやや落ちる点に注意が必要であろう。

aureobacidin A は黒色酵母の産生する環状ペプチドで、ヒトにない真菌特有のターゲット、inositol phosphorylceramide synthase を阻害する殺菌性抗真菌薬である。スペクトラムは *Candida*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* に及び、動物実験でもその有効性が示されており、新たな抗真菌薬として、期待されている。今回の結果でも *Candida* 属、*C. neoformans* には良好な抗菌活性を示し、他の抗真菌薬との交叉耐性がなく、臨床への応用が期待される成績であった。

今回明らかになった実態、特に深在性真菌症由来の真菌に対する薬剤感受性成績では、耐性菌が広まっている様子はみられなかった。しかし、分離される真菌の内訳は、比較的感受性の低い菌種の比率が増加しており、その動向に

注意が必要で、今後本研究調査を続行する意義が大きいものと考えられた。

また、使用できる抗真菌薬の選択肢も広がり、開発中のいくつかの薬剤には更なる臨床効果が期待される。しかし、それぞれの薬剤の抗菌スペクトラムは異なり、菌種によっては従来の薬剤よりも効果の期待できないものも存在する。従来は抗真菌薬の選択肢がそれほどなかったため、真菌の感受性試験や正確な同定検査の必要性はそれほど臨床でも認識されていなかったが、今後は、適切な治療、病原細菌のように耐性菌を蔓延させないためにも検査室での正確な真菌の同定、感受性試験測定は導入を考慮すべきである。

今回の *prospective study* から従来、ほとんど認識されていなかった真菌、*C. curvatus* による深在性真菌症が浮かび上がった。*C. curvatus* 感染症の多くはカテーテル感染など、比較的軽症のものが多かったが、死亡例も 2 例認められる等、宿主の状態によっては致命的になりうることも明らかとなった。これまでにはこのような菌は酵母様真菌ということで、臨床には認識されていなかった可能性が高い。*C. curvatus* は *C. neoformans* に比べ、抗真菌薬の MIC が高く、一旦重症感染症を引き起こした場合には、治療に難渋する可能性がある。*C. curvatus* 感染症はある意味では「新興感染症」とも捉えることができよう。今回観察された *Rhodotorula* 感染症などもこれに類似した範疇—注意すべき新興深在性真菌症の一つと位置付けられると思われた。これらの菌は今後、院内感染として更に増加、蔓延する危険性を孕んでおり、疫学、発生動向などの調査を続行すべきと思われた。

近年、病院内の感染対策、感染症の危機管理が叫ばれている。その一方ではこうした日々の感染症、新興・再興感染症への迅速な対応に不

可欠な感染症検査室の外部委託が次々と押し進められている。真菌検査は感染症検査の中でも専門家が少なく、対応に苦慮することが少なくない。今回、明らかになったような新興深在性真菌症は今後、更に増加することが考えられ、抗真菌薬選択肢が広がるとともに、必ずや耐性の問題も現実化する。こうした中で深在性真菌症の疫学、正確かつ最新の情報を把握し、広く診療に還元していくことが本研究の使命の一つであると考えられた。

E. 結論

関東を中心とした 17 医療機関で 1 年間、*prospective study* を行い、真菌血症由来 203 株について抗真菌薬の感受性を調査した。菌種は *Candida* がほとんどを占め、*non-albicans* が過半数を占めていた。感受性試験では 5-fluorocytosine の耐性は *Candida* 属で 6 株 (3.1%) に、*fluconazole* 耐性は *C. glabrata* 2 株 (9.5%)、*C. krusei* 2 株 (100%) にみられたが、国外の報告に比して、それ程耐性率は高くなかった。これまでにほとんど報告のない、*C. curvatus* が感染症は死亡例もあることから、今後、注意が必要な新興真菌症の一つと考えられた。

臨床現場への深在性真菌症の適切な診断・治療の啓蒙・指導のために、本研究は大きな意義を持つものと思われ、更に研究の継続が必要である。

F. 健康危険情報

国内で発生した真菌血症としては特に感染性、病原性の強い菌種の増加傾向は認められなかったが、従来認識されていない一部の真菌による深在性真菌症が認められた。

G. 参考文献

1. 論文発表

Successful treatment of *Aspergillus* peritonitis in a peritoneal dialysis patient. *Pediatr.Nephrol.* 17 243-245, 2002. Matsumoto N, Shiraga H, Takahashi K, **Kikuchi K**, Ito K.

深在性真菌症の発生動向に関するアンケート調査 アスペルギルス症について. *Jpn.J. Antibiot.* 55 (4) 446-481, 2002. 上原至雅、亀井克彦、**菊池 賢**、榎村浩一、鈴木和男、新見昌一、上 昌広、馬場基男、堀田国元、渋谷和俊、直江史郎.

The trend of imported mycoses in Japan. *J. Infect. Chemother.* 9: 16-20, 2003. Kamei K, Sano A, **Kikuchi K**, Makimura K, Niimi M, Suzuki K, Uehara Y, Okabe N, Nishimura K, Miyaji M.

2. 学会での発表

国内 17 施設における 2001～2002 年の血液由来真菌 197 株の内訳と薬剤耐性調査. 第 77 回日本感染症学会 (福岡)、日本感染症学会雑誌 77 (Suppl) 180, 2003. **菊池 賢**、戸塚恭一、米山彰子、奥住捷子、猪狩 淳、小栗豊子、小林芳夫、上遠野保裕、町田勝彦、保科定頼、斧 康雄、川上小夜子、熊坂一成、矢越美智子、菅野治重、久保勢津子、宮本豊一、砂川慶介、野々山勝人、佐藤智明、大島利夫、前崎繁文、橋北義一、伊藤 章、住友みどり、大塚喜人、岡田 淳、田沢庸子、田中美智男、紺 泰枝.

Eight cases of human infections caused by *Cryptococcus curvatus*. 103rd General Meeting of American Society for Microbiology (Washington DC) Abstract 5226, 2003. N. Tsuruoka, **K. Kikuchi**, C. Piao, T. Yasunami, I. Itoda, K. Totsuka.

平成 14 年度厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)

「輸入真菌症等真菌症の診断・治療法の開発と発生動向調査に関する研究」

分担報告書

輸入真菌症および日和見真菌症の迅速診断法の開発

分担研究者 榎村 浩一 帝京大学医真菌研究センター 助教授

「輸入真菌症および日和見真菌症の迅速診断法の開発」として分担研究者が行った以下の研究課題 (I、II、および III) に関して、本年度の成果ならびに IV 業績を以下に報告する。

I. 18SrDNA を鋳型とした広範囲深在性真菌症 遺伝子診断法適用例の解析

A. 研究目的

我々は、深在性真菌症起因菌を含む多菌種の病原真菌を臨床検体から網羅的に検出できる「真菌症鑑別診断用PCR法」を開発し、1995年から商業運用に供してきた(図1)。当初は第一段階PCRとして、真菌症と非真菌症との鑑別のみを目的としていたが、治療上・診断確定上、遺伝子産物の解析による菌種同定が求められるようになった。

この臨床的要請に基づいて、1997年に第二段階PCRとして増幅産物から起因菌を解析するため、1) 広域真菌 (UP)、2) *Candida* 属 (CP)、3) *Aspergillus* 属 (AP)、および 4) *Cryptococcus neoformans* (CN) の各々に特異的な nested PCR プライマー・システム (図2) を併せて開発し、実用に供した。

しかしながら、これらの検査法について、真菌症例および健常人における十分な検討がなさ

れていないために、陽性/陰性の結果に対する評価に疑問があった。そこで、平成12年度に行なった健常人例に対する検討に引き続き、臨床的真菌症例を対象とした本法検査結果の解析を行い、その適正な使用法と評価基準の検討を目的とした研究を行った。

B. 研究方法

検体は、基本的に血液検体を用い、血中真菌細胞を集菌後、菌体から DNA を抽出精製した標品を鋳型に用いた。一部の検体では粘膜等を検体として、直接菌体 DNA の抽出を行ない鋳型とした。第一段の PCR は、エチジウムブロミド添加下 UV 照射 (EU)、またはサザンハイブリダイゼーション (SH) により検出した。第二段階 (nested) PCR としては、前述 4 種のプライマー対を用いて反応した上で、増幅産物は PCR 直接塩基配列決定法によって確認した (図3)。ここで、起因菌/属の判定に際しては、UP が陽性であり、かつその他の特異プライマーが陽性になっていることと、塩基配列を確認して、UP の結果と一致した配列

が特異プライマーの塩基配列から認められた場合に、その配列を起因菌の塩基配列として採用した。

C. 研究結果

本検討結果を以下に列挙する。

- 1) 臨床的に真菌症と診断される症例の内、本検出系を用いたPCR診断法の陽性率は40%程度に過ぎない(表1)。
- 2) しかし、カンジダ血症を対象にした場合は、陽性結果の信頼性は高い(表2)。
- 3) クリプトコックス症例に対しては、本法に用いたプライマーの性質上感度が得られず、検討した全例で陰性の結果となった(表3)。
- 4) アスペルギルス症については、現システムを用いる以上、カンジダ症検体に比して有用性が低い様に見えるが、評価のためにはより一層の症例を検討する必要がある(表1)。
- 5) 病型・病態によって適切な検体を選択する必要性も示唆される(表1)。

D. 考察

臨床例では、真の真菌症例を把握できず、また検体の選択が不適切な場合があるため、明らかに低い陽性率となっている。その中でもPCR陽性検体から得られた菌種同定結果と臨床診断との一致率には病型毎に違いが認められる。培養同定によって、*Candida*属の分離された症例に限定すれば、本PCR法の結果は90%一致する。但し、培養が陰性の検体に関しては明確な解答を得ることは困難である。真の真菌症例を確定することが困難である以上、本法の感度・特異度に関する議論は厳密には困難である。

また、上記3)に示したクリプトコックス症に対する本システムの低感度の問題は、新しく発売されたキットで解消されている(図4)ことから、今後の検討結果に期待が持たれる。

E. 結論

深在性真菌症対策上、補助診断法としての遺伝子診断法にかけられる期待は大きい。しかしながら、今日に到るまでその感度および特異度、ならびに適用、解釈について論じられることなく用いられて来たきらいは否定できない。しかし、本法による臨床例に関するが、ようやく収集できる状況となりつつある。今回の報告はその中間に位置するものであるが、より一層の症例情報を併せて解析することによって、真菌症遺伝子診断法の今後の発展と限界を考察したい。

F. 健康危険情報

ない。

G. 研究発表

準備中

II. 動物園飼育下の動物における 人畜共通輸入真菌症の研究

A. 研究目的

Filobasidiella neoformans var. *bacillispora* は、臨床的に無性世代名；*Cryptococcus neoformans* var. *gattii* としてよく知られて

いる熱帯型クリプトコックス症起因菌である。本症の臨床像は本邦で通常診られる *F. neoformans* var. *neoformans* によるクリプトコックス症と似ているが、より長期の抗真菌薬化学療法を要し、また中枢神経傷害を残しやすいとされている。今日迄、*F. neoformans* var. *bacillispora* は国内からの分離例がなく、感染例は海外から輸入真菌症として持ち込まれたと考えられるものが、報告されているに過ぎなかった。昨年東京都下の動物園にて飼育されていたクイーンズランドコアラ (*Phascolarctos cinereus* ; 以下コアラ) がクリプトコックス症にて死亡した。コアラにクリプトコックス症が好発することは以前より知られており、本邦をはじめ、諸外国の各動物園においても散発的に死亡例があると言われている。そこで、貴重な生物多様性資源であり、かつ保護動物であるコアラを本菌による感染から守るために、動物園の協力を得て、死亡したコアラと併せて、生存している飼育下のコアラ6頭の鼻腔内菌叢の培養検査(図5)および血清クリプトコックス抗原検査を行い、本邦動物園飼育下のコアラにおける、本菌の保菌状況の一例を明らかにした。

B. 研究方法と結果

コアラ死亡例

- 1) 患畜：ピリー(BIRRI) 4歳雄 出生地：TARONGA ZOO
- 2) 経過：2001年7月中旬から鼻汁、食欲減退が見られた。抗生物質の投与により、鼻汁はいったん

見られなくなった。8月中旬より左眼周囲の腫脹、くしゃみが観察された。8月17日に身体検査を行い、クリプトコックス症と診断された。抗真菌剤、抗生物質、栄養剤などの投与を続けたが、9月16日頃より、ふらつき、旋回運動、斜頸などの神経症状が現れ、衰弱が進み、9月22日13時頃、死亡を確認した。

3) 剖検所見(頭部)：

- 左眼球後部に、クルミ大の組織塊あり。組織塊はゼラチン状で、圧迫すると糊状の液体が滲出する。眼窩周囲の側頭骨(前記の組織塊に接していた部分)が粗剛を呈す。
- 前頭洞、眼窩より後方の鼻甲介、鼻道、口蓋洞に融解したと思われる骨等の組織が充満している

起因菌：剖検肺、鼻腔、大脳、脳幹部の培養から、*C. neoformans* が分離同定(Vitek)された。

本菌の血清型はB、ITS1塩基配列検査により、遺伝型はImaiらによる *C. neoformans* var. *gattii* Asia-1に相当することが示された。以上より、本菌を *F. neoformans* var. *bacillispora* と同定した。本分離株の抗真菌薬感受性は、Amphotericin B, 0.125; Flucytosine, 2; Fluconazole, 8; Itraconazole, 1; Miconazole, 2; Bifonazole, >8; Lanocomazole, 4; Terbinafine, 1 ($\mu\text{g/ml}$)であった。

健常コアラ、飼育師、 および環境中の菌叢検査

同園における健常コアラの鼻腔菌叢および血清抗原検査結果から、発症していないすべてのコアラが *F. neoformans* var. *bacillispora* または、*F.*

neoformans var. *neoformans* を保菌していることが判明した。一方、コアラ飼育環境と食用ユーカリ、および飼育技師鼻腔の培養検査では本菌は分離されないことが確認できた。

C. 考察・結論

コアラにおける *F. neoformans* の常在状況に関する検討は、オーストラリアの野生個体および飼育個体に対して行なわれているが、本邦をはじめ、オーストラリア以外の国における動物園飼育下の個体についての調査はこれが初めてである。

また、*F. neoformans* var. *bacillispora* が国内で生育していることを確認した報告も他には知られていない。

ここで、従来輸入真菌症起因菌として考えられて来た本菌が、国内において生育している事実に対して安全性の評価を行なう必要がある。

今回の調査によって、(i) コアラ飼育環境と食用ユーカリ、および飼育技師鼻腔の培養検査では本菌は分離されないこと、また、もし環境に少量の本菌撒布が生じた場合においても、(ii) *F. neoformans* var. *bacillispora* は、*F. neoformans* var. *neoformans* と異なり、発育可能温度の点から鳥類、その他の動物の腸管内等において生存できないことを考え併せると、本菌による環境もしくは、人体への感染拡大は現状では考え難いと結論できる。本菌感染症をはじめとする深在性真菌症は、通常宿主対宿主感染が認められないことを考慮すると、コアラ国内繁殖例に見られる本菌定着例は、母子垂直伝播によるものであることが推察される。本研究で得られた *F. neoformans* var. *bacillispora* の ITS1 塩基配列がオーストラリアに分布する Imai の Asia-1 型であ

った事実もこの仮説と矛盾しない。

今後貴重な保護動物に対する感染管理上、適切なサーベイランスと環境除菌を考慮する必要がある。また、本研究にみられたように、コアラにおける *F. neoformans* 保菌率が高く、また発症率も無視できない可能性を考えると、積極的な個体除菌も検討課題となる。

尚、本感染症例については、感受性試験結果に基づき、日本農薬（株）より提供された Lanocomazole (100 µg/ml ethanol) を用いて環境除菌を行った。但し、一般的な環境除菌のためには、70%エタノールで充分であろう。

その後、当該動物園からの本菌感染症例は、現在のところ認められない。また、現在他園からもコアラ菌叢調査の依頼があり、今後より多くの本邦動物園飼育下のコアラについて検討する予定である。

F. 研究発表

1) 植村浩一、池田理恵、村上有沙、山田剛、藤崎竜一、西山彌生、内田勝久、山口英世。動物園飼育下のコアラにおける *Filobasidiella neoformans* var. *bacillispora* 感染例および常在例の検討。2002年9月28日 第46回日本医真菌学会総会、千代田区、東京

2) Makimura K, Karasawa M, Hosoi H, Kobayashi T, Kamijo N, Kobayashi K, Hiramatsu H, Akikawa T, Yabe T, Yamaguchi A, Ishida O, Murakami A, Fujisaki R, Nishiyama Y, Uchida K, Yamaguchi H: A Queensland koala kept in a Japanese zoological park was carrier of an imported

fungal pathogen, *Filobasidiella neoformans* var. *bacillispora* (*Cryptococcus neoformans* var. *gattii*). Japanese Journal of Infectious Diseases 55(1): 31-32, 2002.

III. インターネットを用いた病原真菌及び真菌症に関する情報公開に関する研究

A. 研究目的

分散限局している医真菌研究・教育資料の効率的利用と、研究者相互の情報交換を計る目的で、病原真菌情報をデータベース化し、それらをインターネットサーバ上で公開することによって、研究者が容易に（誰もが、自由に、無料で）利用できる知的基盤の整備が必要である。そのために「オンライン病原真菌データベース」（英名：Pathogenic Fungi Database、略称：PFDB、アドレス：<http://timm.main.teikyo-u.ac.jp/pfdb/>）を作成してきた。公開以来、医真菌にかかわる情報の無償共有に賛同する研究者からの情報提供を依頼し、データベース化は病原真菌データベース運営委員会が行っている。PFDBは現在、html:233ページ、画像:2136枚の容量となっており、アクセスは世界各国から、1日に3000-6000件程度を記録している。

B. 研究方法

このアクセス増大に伴い、帝京大学医真菌研究センター内サーバーから切り替え、より接続速度の速い外部専用サーバー上の独自ドメイン(<http://www.pfdb.net/>)からの発信を開始した。この際、従来の「手書きHTML形式」にかえて「phpデータベース」を採用することによって、

- 1)学術文献（写真）の管理・公開手順の簡素化
 - 2)生物多様性データベース専門ロボットによる検索
 - 3)真菌症(臨床画像)ページに対する登録・アクセス制限（医療従事者および研究者に限定）の設定
 - 4)電子ブックCDとしての配布（未施行）を可能にした。
- インターネット上の情報提供による真菌症情報の普及が本研究の目的である。

C. 研究結果と考察

現在も多くの協賛を得て、順次データを更新中である。分散限局している医真菌研究・教育資料の効率的利用と、研究者相互の情報交換を計る目的で、病原真菌データベースを作成し、インターネット上で公開、更新しつつある。病原真菌は単に起因菌であり、研究対象であるのみではなく、国家的生物資源である。従ってこれをデータベース化する作業は学術的、産業的、政治的に必須である。

本データベースは現状においてボランティアデータベースであるため、医真菌にかかわる情報の無償共有に賛同する研究者の情報提供が求められる。

ボランティアデータベースに相当するPFDBは、公的・私的な援助がなければ継続した知的基盤となり得ない。

各方面からの援助獲得を検討し続けたい。

D. 結論

オンライン環境を利用した医真菌研究者の共有的知的基盤の作成に成功し、実効を挙げている。

F. 健康危険情報

ない

G. 研究発表

1) 「オンライン病原真菌データベース」(英名: Pathogenic Fungi Database, 略称: PFDB <http://www.pfdb.net/>)

2) 榎村浩一、渋谷和俊、加納壘、杉田隆、岩口伸一、前崎繁文、望月隆. 病原真菌データベース: PFDB 2002. 2002年9月28日 第46回日本医真菌学会総会, 千代田区、東京

3) 榎村浩一. 病原真菌データベース. 2002年10月14日 公開講演会: 生物多様性研究・教育を支える広域データベース、法政大学自然科学センター、東京

4) 榎村浩一、岩口伸一、加納壘、杉田隆、渋谷和俊、前崎繁文、望月隆. 「病原真菌データベース」 Pathogenic Fungi Database (PFDB)の公開、臨床検査 46(8): 919-924, 2002.

IV 平成14年業績リスト

学会発表

1) 榎村浩一、村上有沙、林谷陽子、内田勝久、山口英世、亀井克彦、横山耕治. 輸入真菌症起因菌遺伝子同定システムの研究. 2002年2月16日 真菌症フォーラム第3回学術集会、千代田区、東京

2) 榎村浩一. 真菌症遺伝子診断・検査法の現状と展望. 特別講演. 2002年3月16日第18回沖縄感染症研究会、那覇、沖縄

3) 榎村浩一、山口英世、亀井克彦、横山耕治. 輸入真菌症起因菌遺伝子同定システムの研究開発、ワークショップ 「細菌感染症の迅速診断法」. 2002年4月4日 第75回日本細菌学会総会、横浜、神奈川

4) Makimura K. The Molecular Diagnosis of Fungal Infection, 2002 May 17th, Japan-Canada Joint Congress on Invasive Fungal Infection. Nagasaki, Nagasaki

5) 大田黒滋、古庄憲浩、鍋島茂樹、有山巖、林純、柏木征三郎、味澤篤、榎村浩一. トキソプラズマ脳症を発症し、経過中、播種性ヒストプラズマ症を合併した後天性免疫不全症候群の一例. 2002年4月12日 第76回日本感染症学会総会 文京区 東京

6) 杉田知妹、榎村浩一、村井容子、中瀬綾、山口英世、永井篤志. アレルギー性気管支肺カンジダ症の一例. 2002年4月12日 第76回日本感染症学会総会 文京区 東京

7) 榎村浩一. 検査室で実施可能な新たな真菌検査法. シンポジウム1. 2002年6月1日 第23回関東医真菌懇話会、新宿、東京

8) 榎村浩一. 真菌症管理への分子生物学的アプローチ. 特別講演. 2002年6月22日 第7回深在性真菌症和歌山フォーラム、和歌山、和歌山

9) 小笠原弓恵、小笠原万里枝、榎村浩一、武藤正彦. チンチラより感染した *Trichophyton mentagrophytes* (*Arthroderma vanbreuseghemii*) による体部白癬の1例. 2002年6月23日 第128回日本皮膚科学会 山口地方会深在性真菌症和歌山フォーラム、宇部、山口

10) 榎村浩一. 真菌症管理への分子生物学的アプローチ. 特別講演. 2002年7月26日 第1

- 回三河呼吸器感染症フォーラム、岡崎、愛知
- 11) 平井明香、加納壘、榎村浩一、安田和雄、小西和世、山口英世、長谷川篤彦。猫由来 *Malassezia* の1菌株。2002年9月28日 第46回日本医真菌学会総会、千代田区、東京
- 12) 榎村浩一、池田理恵、村上有沙、山田剛、藤崎竜一、西山彌生、内田勝久、山口英世。動物園飼育下のコアラにおける *Filobasidiella neoformans* var. *bacillispora* 感染例および常在例の検討。2002年9月28日 第46回日本医真菌学会総会、千代田区、東京
- 13) 内田勝久、榎村浩一、山口英世、比留間政太郎、坪井良治、小川秀興。皮膚糸状菌新鮮分離株における Terbinafine 存在下の継代培養による感受性の変化。2002年9月28日 第46回日本医真菌学会総会、千代田区、東京
- 14) 榎村浩一、渋谷和俊、加納壘、杉田隆、岩口伸一、前崎繁文、望月隆。病原真菌データベース：PFDB2002。2002年9月28日 第46回日本医真菌学会総会、千代田区、東京
- 15) 白木祐美、金子千尋、比留間政太郎、小川秀興、榎村浩一。 *Trichophyton mentagrophytes* による顔面白癬の一例-原因菌の分子生物学的検討-。2002年9月28日 第46回日本医真菌学会総会、千代田区、東京
- 16) 早田名保子、松下明子、比留間政太郎、榎村浩一、小川秀興。 *Trichophyton tonsurans* による小児頭部白癬の1例。2002年9月28日 第46回日本医真菌学会総会、千代田区、東京
- 17) 金子健彦、大野祐樹、金沢博龍、荻原里佳、三関信夫、榎村浩一。 *T. tonsurans* による体部白癬の集団発生例。2002年9月28日 第46回日本医真菌学会総会、千代田区、東京
- 18) 上原至雅、亀井克彦、菊池賢、榎村浩一、鈴木和男、新見昌一、渋谷和俊、上昌弘、馬場基男、堀田国元、直江史郎。深在性真菌症の発生動向に関するアンケート調査-アスペルギル

- ス症について-。2002年9月28日 第46回日本医真菌学会総会、千代田区、東京
- 19) 榎村浩一。深在性真菌症管理への展望。2002年9月30日 深在性真菌症/輸入真菌症シンポジウム-輸入真菌症を中心とした深在性真菌症に対する我が国の現状と取り組み-、国立感染症研究所、新宿、東京
- 20) 榎村浩一。病原真菌データベース。2002年10月14日 公開講演会：生物多様性研究・教育を支える広域データベース、法政大学自然科学センター、東京
- 21) Makimura K. Growth Possibility of Potential Pathogenic Fungi on Board Space Station. 2002. Nov. 18th, The ISLSWG International Workshop on the Microbial Ecology and the Space Environment, International Space Life Science Working Group (ISLSWG), Minato-ku, Tokyo, Japan.
- 22) Makimura K. Detection and Identification of Potential Pathogenic Fungi on Board Space Station. 2002. Nov. 19th, The ISLSWG International Workshop on the Microbial Ecology and the Space Environment, International Space Life Science Working Group (ISLSWG), Minato-ku, Tokyo, Japan.

原著論文

1. Maeda M, Makimura KC, Yamaguchi H: Pityriasis versicolor rubra. Eur J Dermatol 12(2):160-164, 2002.
2. Makimura K, Karasawa M, Hosoi H, Kobayashi T, Kamijo N, Kobayashi K, Hiramatsu H, Akikawa T, Yabe T, Yamaguchi A, Ishida O, Murakami A,

- Fujisaki R, Nishiyama Y, Uchida K, Yamaguchi H: A Queensland koala kept in a Japanese zoological park was carrier of an imported fungal pathogen, *Filobasidiella neoformans* var. *bacillispora* (*Cryptococcus neoformans* var. *gattii*). *Japanese Journal of Infectious Diseases* 55(1): 31-32, 2002.
3. Maebashi K, Kudoh M, Nishiyama Y, Makimura K, Uchida K, Mori T, Yamaguchi H: A Novel Mechanism of Fluconazole Resistance Associated with Fluconazole Sequestration in *Candida albicans* Isolates from a Myelofibrosis Patient. *Microbiology and Immunology* 46(5): 317-326, 2002.
4. Yamada Y, Makimura K, Merhendi H, Ueda K, Nishiyama Y, Uchida K, Yamaguchi H, Osumi M: Comparison of different methods for extraction of mitochondrial DNA from human pathogenic yeasts. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 55(4): 122-125, 2002.
5. Hirai A, Kano R, Makimura K, Yasuda K, Konishi K, Yamaguchi H, Hasegawa A: A unique isolate of *Malassezia* from a cat. *Journal of Veterinary Medical Science* 64(10): 957-959, 2002.

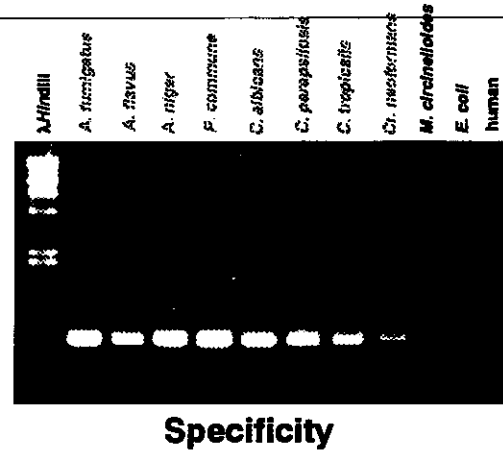
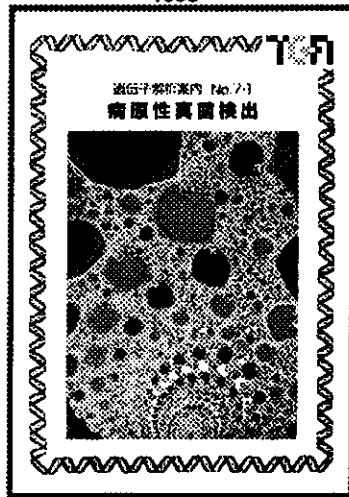
総説・著書

- 5) 榎村浩一. 遺伝子診断の現状と可能性. 特集: 肺真菌症の診断の進歩. *日本胸部臨床* 61(1): 19-27, 2002.
- 6) 榎村浩一. *Pneumocystis carinii* の生物学的位置付け. pp.38-42, 工藤翔二、土屋了介、金沢実、大田健 編, *Annual Review 呼吸器* 2002, 中外医学社, 東京, 2002.
- 7) 榎村浩一. 呼吸器真菌症に対する遺伝子診断・検査法の現状と可能性. *The Japanese Journal of Antibiotics* 55(1): 109-119, 2002.
- 8) 榎村浩一. *Malassezia* 属分子生物学的同定の現状と研究の展望. *日本医真菌学会雑誌* 43(2): 69-71, 2002.
- 9) 榎村浩一、岩口伸一、加納壘、杉田隆、渋谷和俊、前崎繁文、望月 隆. 「病原真菌データベース」 Pathogenic Fungi Database (PFDB)の公開、*臨床検査* 46(8): 919-924, 2002.
- 10) 榎村浩一、杉田知妹、清水禎彦、伊藤雄二、村井容子. 目で見る症例 侵襲性アスペルギルス症、*内科* 90(2): 341-345, 2002.
- 11) 上原至雅、亀井克彦、菊池賢、榎村浩一、鈴木和男、新見昌一、上昌広、馬場基男、堀田国元、渋谷和俊、直江史郎. 深在性真菌症の発生動向に関するアンケート調査 アスペルギルス症について. *The Japanese Journal of Antibiotics* 55(4): 446-481, 2002.
- 12) 山田剛、榎村浩一. 遺伝子検査-深在性真菌症起因菌同定のための分子生物学的アプローチ-、特集 わだいの真菌症、*Medical Technology* 30(10): 1167-1171, 2002.
- 13) 山田陽子、大隈正子、榎村浩一、山口英世. 脂質要求性酵母 *Malassezia* 属感染症の遺伝子診断と起因菌の分子生物学的同定法研究の現状. *The Japanese Journal of Antibiotics* 55(5): 493-499, 2002.
- 14) 亀井克彦、榎村浩一、菊池賢、鈴木和男、新見昌一、上原至雅. 輸入真菌症診断ハンドブック、厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業) 輸入真菌症等真菌症の診断・治療法の開発と発生動向調査に関する研究班、国立感染症研究所 生物活性物質部、新宿、東京、2002.

☒ 1

Specificity of the PCR with primer pair, B2F and B4R

Pathogenic Fungi Detection System
(Toyobo Gene Analysis Co.)



☒ 2

Specificity of B2FxB4R primer-pair and nested primer system

Species	Primer-pair				
	1st Primer B2FxB4R	Nested Primer			
		UP	AP	CN	CP
<i>Aspergillus fumigatus</i>	+	+	+	-	-
<i>A. niger</i>	+	+	+	-	-
<i>A. flavus</i>	+	+	+	-	-
<i>Penicillium marneffel</i>	+	+	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	+	+	-	-	+
<i>C. glabrata</i>	+	+	-	-	+
<i>Cryptococcus neoformans</i>	+	+	-	+	-
<i>Trichosporon asahii</i>	+	+	-	-	-
<i>Trichophyton rubrum</i>	+	+	-	-	-

図 3

Detection and Identification of Fungal Pathogen
Using PCR and Direct-Sequencing

Clinical Specimen (100-250 μ l)

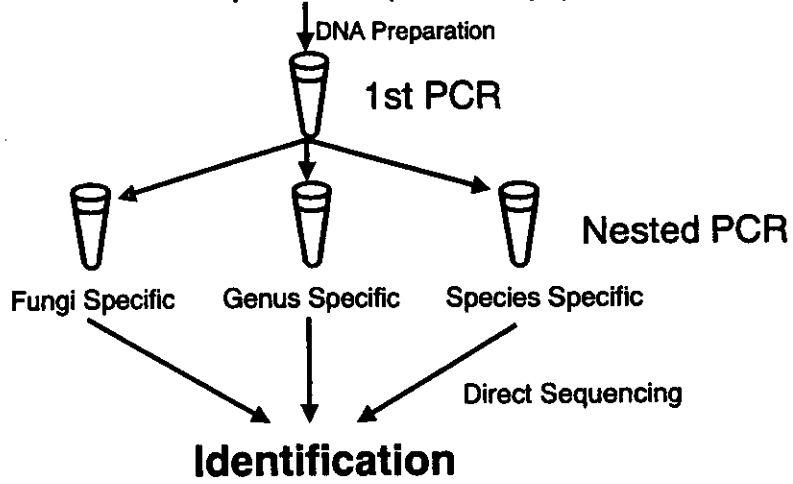


表 1

深在性真菌症臨床診断70例におけるPCR法の結果

臨床診断	症例数	PCR陽性件数	PCR陽性割合(%)	PCR対臨床診断一致率
慢性的アスペルギルス症	14	6	42.9	50
慢性増殖性アスペルギルス症	9	4	44.4	50
肺アスペルギローマ	23	8	34.8	37.5
播種性カンジダ症(カンジダ血症)	12	5	41.7	100
食道カンジダ症	7	1	14.3	0
その他の深在性真菌症	5	1	20	-

表2 *Candida*属の配列が増幅された検体と検体背景

No.	年齢性別	検体	増幅された配列	PCR	検体背景	増幅された配列	PCR	検体背景
1	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
2	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
3	62 f	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
4	78 f	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
5	49 f	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
6	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
7	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
8	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
9	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
10	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
11	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
12	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
13	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
14	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
15	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
16	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
17	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
18	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
19	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
20	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
21	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
22	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
23	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
24	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
25	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
26	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
27	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
28	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
29	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
30	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
31	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
32	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
33	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
34	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
35	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
36	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
37	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
38	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
39	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
40	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
41	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
42	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
43	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
44	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
45	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
46	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
47	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
48	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
49	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
50	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
51	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
52	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
53	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
54	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
55	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
56	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
57	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
58	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
59	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
60	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
61	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
62	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
63	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
64	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
65	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
66	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
67	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
68	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
69	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
70	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
71	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
72	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
73	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
74	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
75	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
76	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
77	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
78	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
79	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
80	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
81	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
82	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
83	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
84	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
85	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
86	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
87	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
88	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
89	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
90	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
91	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
92	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
93	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
94	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
95	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
96	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
97	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
98	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
99	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>
100	53 m	尿	CAN	+	<i>C. albicans</i>	CAN	+	<i>C. albicans</i>

表3 クリプトコックス症例に対する適用結果

No.	年齢性別	臨床診断	培養陽性/鏡検	ラテックス凝集反応	PCR
1	53 m	肺クリプトコックス症	血液 -	血清64倍*	血液 -
2	53 m	肺クリプトコックス症	血液 -, 痰液: <i>C. parapsilosis</i>	血清1024倍**	血液 +***
3	62 f	肺クリプトコックス症	経皮的肺生検: <i>Cryptococcus</i> 属	陰性**	血液 -
4	78 f	肺クリプトコックス症	BALF: <i>C. neoformans</i>	2倍**	血液 -
5	49 f	肺クリプトコックス症	BALF: <i>C. neoformans</i>	256倍*	血液 -

* A. ストラクカ・クリプトコックス, ** 70℃ 4h 外・クリプトコックス凝集, *** *C. albicans* / *parapsilosis* / *tropicalis* 群

図4

Specificity of PCR Based Fungal Infection Diagnostic System
Nested PCR

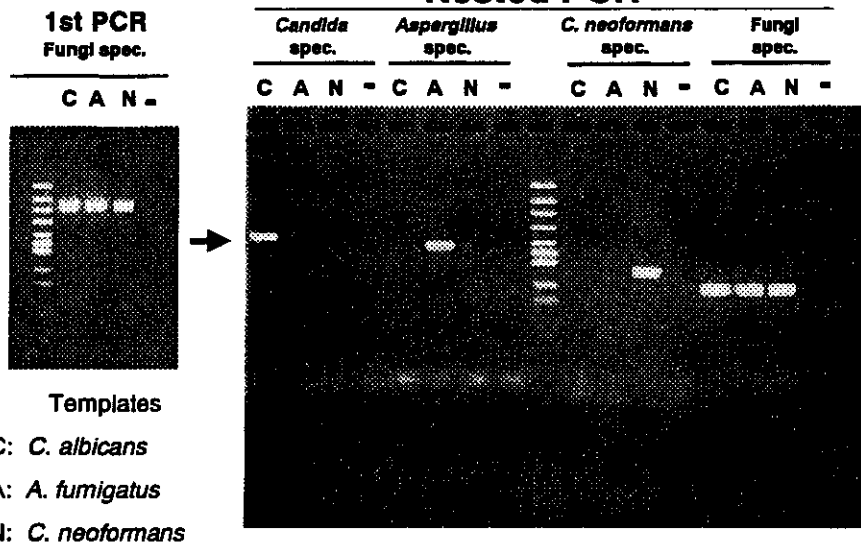
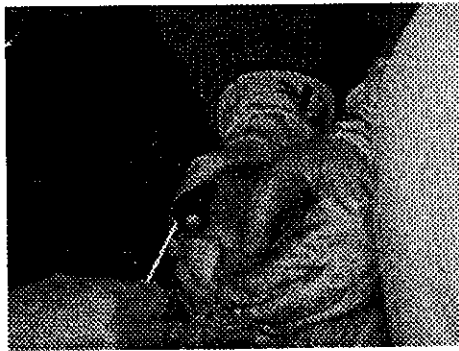
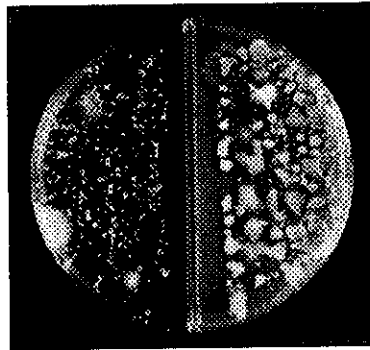


図 5



コアラ鼻腔からの検体採取



タムタム (18歳雄) 鼻腔スミア培養像
(CT寒天培地/バードシード寒天培地、
30℃、3日間培養)

平成14年度厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

真菌感染抵抗性の解析と治療の評価系の開発
—好中球機能の関与と慢性疾患発症に関する研究—

分担者： 鈴木 和男 国立感染症研究所 生物活性物質部 室長

研究要旨： これまで、好中球の機能不全に起因して真菌症が発症することを、慢性肉芽腫症(gp91^{phox} KO)マウスおよび Myeloperoxidase(MPO)遺伝子欠損マウスを用いた *in vivo* での感染実験から実証した。また、本年度は、特に、*Cryptococcus neoformans* 感染に対する生体防御における MPO の役割についても MPO 欠損マウスを用いた個体レベルでの検討を加えた。野生型マウスは *C. neoformans* 肺感染後半年間まったく死亡しなかったのに比し、MPO 欠損マウスは 2 ヶ月以内にすべてが死亡した。一方、これまで、*Candida* 成分 (*Candida albicans* - derived substances (CADS)による冠状動脈炎の誘導の要因が、MPO であることを報告してきた。本年度は、*Candida* 成分から冠状動脈炎誘発分子を特定するとともに、好中球機能解析および免疫機構を解析した。その結果、CAWS の腹腔内投与により、血中 MPO-ANCA の上昇と冠状動脈炎が誘導された。*in vitro* での脾細胞培養系において、CAWS 低濃度ではサイトカイン産生促進作用を、高濃度では細胞障害作用とサイトカイン産生抑制作用を示したが極端に低下していた。また、新たに、システムとして開発した *in vivo* イメージングにおいては、CAWS に、anti-mouseMPO および fMet-Leu-Phe も加えることによって腎血管傷害が誘導され、血流速度の低下、血流停止、血液の逆流が観察され、腎表面血流の停止や血管内皮への白血球の接着が観察された。一方、内皮細胞傷害に関与する MAPK のカスケードを検討した結果、血管内皮細胞のアポトーシスに関わるシグナル伝達の変化は、Caspase8 と連動する p38MAPK の関与がしていた。

尚、本研究は、大川原明子、長尾朋和、越尾修、赤川久義、高野幸枝、倉文明、渡辺治雄（以上、国立感染症研）、直江史郎、高橋啓、大原関利章（以上、東邦大・医・大橋病院）、荒谷康昭、小山秀機（以上、横浜市大・木原研）、大野尚仁、三浦典子（以上、東京薬大）、馬淵綾子（日本医大）Nobuyo Maeda（ノースカロライナ大 USA）、Mary Denauer（インディアナ大）の各博士の協力のもとに行なわれた。

A. 研究目的

真菌感染防御にとって、重要な生体防御機能を担う好中球の機能については、これまで、カンジダ症やアスペルギルス症は、殺菌酵素の不全を有する好中球機能の低下による日和見感染の結果として引き起こされることをわ

れわれは報告してきた (Aratani et al. J. Infect. Dis. 185: 1833-1837, 2002)。また、MPO 遺伝子欠損および gp91^{phox} 欠損マウスを用いて解析し、*Candida albicans* は、主に、MPO によって産生される OCIによって殺菌されることを明らかにした (Aratani